Aus dem Hygienischen Institut der Universität Göttingen.
Direktor: Professor Dr. Schütz.

Beziehungen zwischen Nährbodenmenge und Bakterienernte.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt am 2. 11. 1937

von

Edith Wedemann
aus Arnstadt (Thür.).

Göttingen 1938

Druck: Göttinger Handelsdruckerei.

Berichterstatter Professor Dr. F. Schütz.

Tag der mündlichen Prüfung 10. Dezember 1937.

Bei der hervorragenden Stellung, die die aktive Immunisierung mit abgetöteten oder in ihrer Wirkung abgeschwächten Krankheitserregern in der modernen Prophylaxe der Infektionskrankheiten einnimmt, ist die Gewinnung der notwendigen Impfstoffe nicht mehr allein von medizinischem, sondern in hohem Maße auch von volkswirtschaftlichem Interesse.

Handelt es sich doch heute bei der Vaccinebereitung um eine Fabrikation großen Stils, deren Grundlage bei uns der Agar-Agar, ein Einfuhrartikel, darstellt, für den bislang noch kein gleichwertiger Ersatz zur Verfügung steht.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, das Herstellungsverfahren so rentabel wie möglich zu gestalten bezüglich des Aufwandes an Agar-Nährboden und der auf ihm erzielten Bakterienernte.

Diese Frage der wirtschaftlichsten Methode, das heißt, des optimalen Verhältnisses zwischen aufgewandter Nährgallerte und erzielter Ernte, von russischen Autoren in weniger konkreter Form bereits gestellt und bearbeitet, war Gegenstand meiner Untersuchungen.

I.

Schon von jeher ist bei Betrachtung der quantitativen Seite der Bakterienvermehrung ein merkwürdiger Widerspruch zwischen einem nach gewisser, an der Lebensdauer der Kultur bemessen, kurzer Zeit eintretendem zahlenmäßigen Stillstand der Bakterienvermehrung und schließlichem Absinken der Zahl der lebenden Mikroben und der noch nicht einmal annähernden Erschöpfung des Nährbodens bemerkt worden.

Von den älteren Autoren wurde zur Erklärung dieses Phänomens zunächst die Bildung von Stoffwechselprodukten herangezogen, die möglicherweise von hemmendem Einfluß auf den weiteren Lebensprozeß und die Vermehrung hätten sein können.

So glaubte Eijkmann (1) auf Grund eingehender Versuche mit dem Bakt. coli derartige wachstumshemmende Stoffwechselprodukte in Nährgallerten (Gelatine und Agar) nachgewiesen zu haben, die er als thermolabil, diffusibel, aber durch Porzellanfilter nicht filtrierbar charakterisierte. Außerdem sprach er ihnen eine gewisse elektive Wirkung zu, insofern als, mit zahlreichen Ausnahmen zwar, die eigene Art durch diese Stoffe stärker ge-

hemmt zu werden schien als fremde bezw. auch verwandte Arten.

Conradi und Kurpjuweit (2), (3) wollen derartige Stoffe auch in flüssigen Nährböden gefunden haben, die, ebenfalls diffusibel, thermolabil, unfiltrierbar, alkoholunlöslich, parallel mit der Wachstumsintensität der Mikroorganismen in der Bouillon an Menge zunehmen.

Auch Rahn (4), der im Gegensatz zu den vorigen Autoren nicht das Bakt. coli sondern das Bakt. fluorescens liquefaciens als Versuchsbakterium benutzte, schloß sich ihrer Ansicht an.

Desgleichen Moro und Murath (5) und andere Autoren, die die Vermehrungskurve der verschiedensten Keimarten in den verschiedensten Nährlösungen beobachteten.

Gegen die Bildung solcher spezifischen entwicklungshemmenden Stoffwechselprodukte in flüssigen Nährböden erhob schon Eijkmann Einspruch, der sie nur in Nährgallerten, nicht aber in Bouillon nachweisen konnte.

Die inzwischen vorliegenden eingehenden Versuche von Bail (6), (7), Singer und Hoder (8) haben aber ein gänzlich neues Licht auf das Problem der Bakterienvermehrung geworfen, wenigstens soweit diese in flüssigen Nährböden stattfindet.

Danach ist die einzelne Kultur als Population aufzufassen, deren Vermehrung, zahlenmäßige Begrenzung nach oben und Abnahme weit eher soziologischen inneren Gesetzmäßigkeiten als Schädigungen durch die Außenwelt in Form von Stoffwechselprodukten unterliegt.

Der Anstoß zur Wiederaufnahme der Untersuchungen über Bakterienvermehrung ging von der Bakteriophagenforschung aus. Denn die Bakteriophagenvermehrung, unabhängig von dem umgebenden Medium und allein an die Vermehrung der zugehörigen Bakterien gebunden, unterliegt ebenfalls einer zahlenmäßigen Begrenzung nach oben.

Die grundlegenden Beobachtungen, die Singer und Hoder bezüglich der Bakterienvermehrung in flüssigen Nährböden machten, lassen sich kurz dahin skizzieren, daß in einer großen Reihe von Versuchen mit einer großen Zahl verschiedener Keime die Maximalzahl der lebenden Keime innerhalb der ersten 24 Stunden der Bebrütung erreicht ist, daß sie sich dann je nach Widerstandsfähigkeit der einzelnen Keime kürzere oder längere Zeit konstant auf der gleichen Höhe hält, um schließlich langsam abzusinken. Weiterhin zeigte sich, daß bei Beimpfung gleich großer Mengen derselben Nährflüssigkeit mit ein und derselben Keimart (in diesem Falle wurde das Bakt. dysenteriae Flexner gewählt) nach Ablauf der zur Erreichung der

Maximalzahl notwendigen Bebrütungszeit die Konzentration der lebenden Keime in allen Proben zahlenmäßig die gleiche war.

Änderungen der Temperatur sowie der Einsaatmenge hatten lediglich zeitliche Verschiebungen in der Erreichung der Höchstzahl der gleichzeitig Lebenden, von Bail als M-Konzentration bezeichnet, zur Folge, waren jedoch ohne jeden Einfluß auf diese Zahl selbst. Und was merkwürdiger ist, selbst bei Zusatz angeblich wachstumsfördernder Stoffe wie Serum (Singer und Hoder bei Staph. pyog. aur.), Ascites (Singer ünd Hoder bei Streptokokken), Zucker (Singer und Hoder bei Bakt. dys. Flexner) wie auch bei vermehrtem Sauerstoffangebot durch Luftdurchleitung (Singer und Hoder bei Vibrio cholerae) wurde die M-Konzentration = Grenzzahl der gleichzeitig Lebenden nicht erhöht. Erhöht wurde lediglich in manchen Versuchen die Schnelligkeit, mit der sie erreicht wurde und stets die am Trübungsgrade kenntliche Gesamtmasse der Keime, die sich demnach über die M-Konzentration hinaus nur aus Bakterienleichen zusammensetzt.

Um dem Vorwurfe eines möglichen Überangebotes an Nährstoffen durch die erfahrungsgemäß sehr nährstoffreiche übliche Fleischbrühe zu begegnen, verdünnte Bail diese 20fach mit physiologischer Kochsalzlösung und fand dieses Gemisch noch ebenso geeignet zur Hervorbringung der Grenzzahl wie die unverdünnte Bouillon, denn beide Lösungen ergaben nahezu die gleichen Werte an lebenden Keimen.

Hatten diese Versuche bereits eine bemerkenswerte Unabhängigkeit der Maximalzahl der lebenden Keime von der Zusammensetzung des umgebenden Milieus gezeigt, so blieb noch zu untersuchen, ob nicht diese Begrenzung nach oben doch in ursächlichem Zusammenhange mit der Umwelt stände und etwa durch Hemmungsstoffe im Sinne Conradis, Kurpjuweits und Rahns oder durch Nährbodenerschöpfung bedingt sei. Dem Nachweis dieser hypothetischen Stoffe sowie der vermuteten Nährbodenerschöpfung galten im wesentlichen die weiteren Untersuchungen Bails, Singers und Hoders.

Singer und Hoder brachten zu diesem Zwecke große Mengen abgetöteter Bakterien in frische Bouillon, die sie dann mit der gleichen Art und verwandten Keimarten beimpften. Obgleich die Menge der eingebrachten toten Keime und der eventuellen Stoffwechsel- und autolytischen Zerfallsprodukte das in der frischen Bouillon mögliche Maß weit überschritt, wurde keine Wachstumshemmung bemerkt. Ebensowenig wirkte ein Extrakt einer weit größeren Kultur, gewonnen durch deren Abtötung bei 60° und

6stündige Extraktion mit Kochsalzlösung, der mithin die Stoffwechselprodukte und in Lösung gegangene Leibessubstanz einer riesigen Bakterienmenge enthalten mußte, nachdem er mit frischer Bouillon versetzt war, auf die eingeimpften lebens- und vermehrungsfähigen Keime derselben Art und verwandter Arten in irgendeiner Weise wachstumshemmend. Auch eine bereits 24 Stunden, d. h. bis zur Erreichung der M-Konzentration bebrütete Bouillon-Kultur zeigte nach keimdichter Filtration und Wiederbeimpfung erneutes Wachstum, das bestenfalls etwas hinter dem vorangehenden zurückblieb.

Schien schon damit der Einfluß von Hemmungsstoffen und Nährbodenerschöpfung widerlegt, so wurde der entscheidende Gegenbeweis dadurch geführt, daß nach Verimpfung einer künstlichen M-Konzentration in frische Bouillon keine weitere Vermehrung mehr stattfand, während die Einbringung der doppelten oder mehrfachen M-Konzentration ein Absterben der überschüssigen Keime bis auf die Zahl der M-Konzentration zur Folge hatte. Demnach erschien den genannten Autoren „die mit der M-Konzentration erreichte Zahl der Bakterien in der Flüssigkeit, d. h. die bei verschiedenen Arten verschiedene M-Konzentration selbst als das Hindernis einer weiteren Zunahme, die sonst nach der Beschaffenheit der Umwelt durchaus möglich gewesen wäre".

Sehr ähnliche Versuche machte Bail und faßte seine Ergebnisse dahin zusammen, „daß es für jede Bakterienart eine Höchstzahl von Individuen gibt, welche in der Maßeinheit einer Nährlösung gleichzeitig lebend vorhanden sein können". (Gesetz der M-Konzentration)

Bei welcher Populationsdichte diese M-Konzentration erreicht ist, ist eine Funktion der spezifischen Beschaffenheit der Bakterienart, somit rassisch und artlich gebunden wie andere vegetative Fähigkeiten, etwa die Milchzuckervergährung, auch und nicht eine solche der Umwelt.

Es lassen sich nach Bail drei festumrissene Stadien in der Dynamik der Bakterienvermehrung auf flüssigen Nährböden erkennen:

1. Der Jugendzustand, das Stadium der Lebendzellzunahme.

In diesem Stadium findet eine üppige und rasche Vermehrung in Mehrzahl statt bis zur Erreichung der M-Konzentration. Der Vorgang ist bei einer Bebrütungstemperatur von 37° innerhalb der ersten 20 Stunden abgelaufen. Er ist durch größere Ein-

saaten abkürzbar, durch kleinere zu verlängern, durch Einsaat der M-Konzentration aufzuheben.

2. Der Reifezustand, das Stadium des Lebendzellgleichstandes, der M-Konzentration.

Wie die Erfahrungen gelehrt haben, ist die M-Konzentration keine Erscheinung von momentaner Kürze, sondern die Bakterienkultur ist durchaus imstande, sich längere Zeit auf dieser Höhe lebend zu erhalten. Wie Bail durch Hinzuziehung von Bakteriophagen zeigen konnte, befindet sich die Population während dieses Zeitintervalls auch hinsichtlich der Vermehrung keineswegs im Zustande völliger Ruhe sondern durchaus in demjenigen der Teilung, nur führt diese nicht mehr zu einer zahlenmäßigen Zunahme der Lebenden. Über die Ursache dieses Phänomens konnte Bail kein klares Bild gewinnen, und macht vermutungsweise ein mit der Vermehrung genau Schritt haltendes Absterben dafür verantwortlich oder aber einen abnormen Teilungsmodus, bei dem nur der eine Teil leben bleibt, während der andere nach erfolgter Teilung sofort abstirbt.

Im dritten Stadium tritt die Kultur in den Greisenzustand ein, gekennzeichnet durch Aufhören der Vermehrung, Ruhezustand der Überlebenden, Entartung und massenhaftes Absterben. Dieses Altern soll in Agar-Zuchten durch Verkürzung des Reifezustandes sehr viel rascher eintreten, eine Erklärung dafür, daß die Bakterienmasse auf Agar meist aus vielmehr Leichen als lebenden Zellen besteht.

Diese Tatsachen, durch Experimente von vollkommen sicherer Reproduzierbarkeit erhärtet und im Rahmen einer Arbeit über die Biochemie pathogener Erreger von Julius Hirsch (9) für Choleravibrionen nochmals bestätigt, verlangten nach einer ursächlichen Erklärung, die Bail in zwei Richtungen für möglich hält.

Einmal macht er die bis jetzt noch sehr spekulative Annahme der M-Einheit als des Lebensraumes, dessen jedes Bakterium für seine Existenz unbedingt bedarf und der je nach Art und Rasse verschieden groß ist. Er sieht demzufolge die Maßeinheit jeder Nährlösung eingeteilt in lauter M-Einheiten, deren jede einzelne von einem Bakterium besetzt werden kann. Es findet nun so lange eine zahlenmäßige Zunahme an Keimen statt, als noch M-Einheiten verfügbar sind. In dem Moment aber, wo sämtliche M-Einheiten besetzt sind, fehlt der Lebensraum für jegliches Mehr an lebenden Individuen, und es tritt der vorher be-

schriebene, in seinen inneren Formen nur zum Teil geklärte Lebendzellgleichstand ein.

Dieser biologischen Erklärung stellt Bail jedoch an anderer Stelle eine rein physikalisch-chemische Betrachtungsweise gegenüber, indem er die letzte Ursache der Populationsgrenze der M-Konzentration in den für alle kolloidalen Lösungen geltenden Konzentrationsgesetzen vermutet. Denn ebenso wie beim Überschreiten einer gewissen Dichtigkeit in jeder Suspension Zusammenfließen und Ausflockung der einzelnen Teilchen stattfindet, beobachtete Bail bei künstlich hergestellten mehrfachen M-Konzentrationen lebender Bakterien ein spontanes Absetzen derselben, wobei aber ein Trübungsgrad der Suspension erhalten blieb, der demjenigen der einfachen M-Konzentration entsprach.

Herrscht also über die letzten Ursachen des Gesetzes der M-Konzentration auch noch keine völlige Klarheit, so ist doch durch seine Auffindung an sich die Bakterienvermehrung in flüssigen Nährmedien aus dem Bereich der relativen Entwicklungskurve in denjenigen der absoluten Zahl gerückt worden.

Es sei hier jedoch nochmals hervorgehoben, daß diese durch äußere Umstände unbeeinflußbare Gesetzmäßigkeit sich ausschließlich auf die Zahl der lebenden Keime einer Kultur bezieht, und daß von Bail, Singer und Hoder der bekannte günstige Einfluß gewisser wachstumsfördernder Nährbodenzusätze auf die Höhe der Gesamtkeimzahl, die sich ja aus Lebenden und Toten zusammensetzt, ausdrücklich betont wird; wie denn auch die bakteriologische Praxis diese Erkenntnis in ihren verschiedenen Züchtungsverfahren (von denen hier nur die Luftdurchleitung und der von Hahn und J. Hirsch (10) empfohlene Glukose-Zusatz bei Züchtung von Cholera-Kulturen erwähnt seien) zum Zwecke größerer Gesamtausbeute allgemein verwertet.

Weit weniger geklärt hinsichtlich irgendeiner Gesetzmäßigkeit ist jedoch die Vermehrung auf festen Nährböden. Bail begnügt sich in seinen Arbeiten mit folgendem Hinweis: „Zwar gibt es auch für die Vermehrung auf Agar eine M-Konzentration, die aber eine ganz andere ist als in Flüssigkeiten, hochgradig von der prozentuellen Stärke des Agars, wie bei organischen Kolloiden überhaupt, abhängt und einer ganz eigenen und schwierigen Untersuchung bedarf. Wahrscheinlich kommt aber für die sog. festen Nährböden noch etwas anderes hinzu".

Zur Frage der Mikrobenzahl auf festen Nährböden nehmen O. Gartoch und M. Kanewskaja (11) in einer 1932 veröffentlichten Arbeit Stellung.

Sie stellten bei einem Versuche mit Schrägagarröhrchen fest, daß die zu einer bestimmten Menge Shiga-Kruse in abfallenden Dosen verimpfte andere Bakterienart nach 48 stündiger Bebrütung in allen Röhrchen die annähernd gleiche Keimzahl erreicht hatte.

Das gleiche Resultat erhielten sie nach 48 Stunden bei isoliertem Wachstum des betreffenden Bakteriums, das wieder in abfallenden Einsaatmengen auf Schrägagarröhrchen gebracht worden war.

Hierin sehen die Autoren eine gewisse Ähnlichkeit mit dem vorher beschriebenen gesetzmäßigen Wachstum auf flüssigen Nährböden und nehmen daher an, daß unter gewissen Bedingungen das Gesetz der Absoluten Bakterienzahl auch auf feste Nährböden anwendbar sei, was bereits von Bail angedeutet wurde.

Allerdings setzen sich Gartoch und Kanewskaja mit der Angabe, daß in den mit kleinen Einsaatmengen beschickten Reagenzgläsern regelmäßig eine größere Anzahl lebender Keime vorhanden gewesen sei als in den massiver besäten, sofort in grundsätzlichen Widerspruch zu dem Begriff und dem Gesetz der Absoluten Bakterienzahl. Denn nach den Bail'schen Versuchen und seiner Definition betrifft die Absolute Bakterienzahl ja gerade die lebenden Keime und nur diese.

Daß andererseits unter den gleichen Bedingungen was Nährbodenmenge, -zusammensetzung, Temperatur usw. anbelangt auch bei verschieden großer Einsaat der gleichen Bakterienart nach genügend langer, in diesem Falle von 48 Stunden sogar reichlicher Bebrütungszeit schließlich eine gleich große Gesamtmasse an Bakterien erreicht wird, nimmt nicht weiter wunder. Jedoch ist daraus noch keinerlei Parallele zu der für flüssige Nährböden geltenden Gesetzmäßigkeit zu ziehen.

In Versuchen mit Agarplatten, die mit verschieden konzentrierten Emulsionen der gleichen Bakterienart beimpft worden waren, zeigte sich, daß eine Verringerung der Einsaat um das Zehnfache von 4440 auf 444 Kolonien für den Ertrag an lebenden Keimen gleichgültig war. Bei 100facher Verringerung der Einsaat (45 Kolonien) betrug die Verringerung der Ernte (immer bezüglich der Lebenden) weniger als die Hälfte, während bei weiterer Verdünnung (4 Kolonien pro Platte) eine auffallende Abnahme der Mikrobenzahl auf weniger als $^1/_{10}$ eintrat.

Dasselbe war bereits in einer weiter zurückliegenden Arbeit von Gotschlich und Weigang (12) festgestellt worden. Ihre Versuche galten, im Rahmen einer etwas anderen Problemstellung zwar, ebenfalls der Kontrolle der Abhängigkeit der nach ge-

wisser Zeit ausgewachsenen Bazillenzahl von der Konzentration der Besäungsflüssigkeit.

Ihre Ergebnisse gehen dahin, daß die Zahl der nach 20 stündiger Bebrütung bei 37° vorhandenen lebenden Keime in weiten Grenzen unabhängig von der Konzentration der Beimpfungsflüssigkeit ist, denn die 20-fache Verdünnung einer bestimmten Ausgangskonzentration lieferte noch die gleiche Zellzahl wie diese selbst. Auch bei Gotschlich und Weigang findet sich jedoch schon die Einschränkung, daß bei allzu kleiner Einsaat die Ernte sowohl im Hinblick auf die Menge der lebenden Keime als auch auf die Gesamtmasse der Bakterien wesentlich verringert wird, was durch unbewachsen und unausgenutzt bleibende Nährbodenstellen ohne weiteres erklärbar ist.

Von den russischen Autoren werden aus den von ihnen mitgeteilten Versuchen allerdings Schlüsse gezogen, die in ihrer Formulierung weit größeren Anspruch auf Allgemeingültigkeit und Grundsätzlichkeit erheben und folgendermaßen lauten: die Beständigkeit der Mikrobenzahl ist im großen ganzen, und bis zu einer gewissen Grenze nach unten, unabhängig von der Dichte der Beimpfungsemulsion und automatisch durch die Beziehungen zwischen Nährboden und Bakterien reguliert. Die Bakterienmenge einer Kolonie ist bei sonst gleichen Bedingungen umgekehrt proportional der Zahl der gesamten Kolonien, wofür die bekannte Erscheinung des Größenunterschiedes zwischen Kolonien bei massiver Aussaat und bei Aussaat vereinzelter Keime angeführt wird.

In diesem „Selbstregulationsmechanismus" zwischen Mikrobenzahl und Nährboden erblicken die Verfasser den Ausdruck einer Gesetzmäßigkeit, nach der die Ausnutzung fester Nährböden erfolgen könnte, und glauben darin eine Parallele zu dem Gesetz der M-Konzentration in flüssigen Nährböden sehen zu dürfen.

Sie halten es daher auch für möglich, daß auf festen Nährböden der Ernährungsradius der verschiedenen Bakterien, analog zu der M-Einheit Bails, je nach Art verschieden groß und bis zu einer gewissen Grenze art- und gruppenspezifisch sei.

Sie kontrollierten weiter die Abhängigkeit der Mikrobenkonzentration von der Ernährungsquelle der einzelnen Kolonie und glaubten bei einer Verdoppelung der Agarmenge pro Platte auch den möglichen Ernährungsradius zu verdoppeln und erwarteten demzufolge eine doppelte Mikrobenkonzentration.

Erscheint schon die Voraussetzung durch eine einfache Verdoppelung der Dicke der Agarschicht für oberflächliche Kolonien

den Ernährungsradius ganz allgemein verdoppelt zu haben, etwas zweifelhaft, so überraschen die mitgeteilten Resultate noch weit mehr, denn es soll nicht nur die doppelte sondern die vierfache Mikrobenkonzentration dadurch erzielt worden sein.

Der Versuch zu einer befriedigenden Erklärung dieser Erscheinung wird nicht unternommen.

In einem anderen Fall soll nach 24 stündiger Bebrütung auf dicken Platten von 100 ccm Agar das Doppelte, nach 48 Stunden das Dreifache an lebenden Keimen vorhanden gewesen sein gegenüber einer dünnen von 50 ccm Agar gegossenen Platte.

Gegen diesen Befund sprechen die schon weiter zurückliegenden Beobachtungen Gotschlichs und Weigangs an Cholera-Kulturen auf Agar. Sie konnten keine wesentlichen Differenzen bezüglich des Gehaltes an lebenden Keimen in gleich großen Teilen der Kultur nachweisen, die vom oberen, mittleren und unteren Drittel einer aufrechtstehenden Strichkultur entnommen waren und sind daher der Ansicht, daß die Verschiedenheit der Dicke des Nährbodens im oberen und unteren Teil des schräg erstarrten Agar-Röhrchens für die Zahl der Lebenden belanglos sei.

Im Einklang hiermit stehen auch Resultate jüngeren Datums, die von Ilzhöfer und v. Angerer (13) mitgeteilt worden sind. Danach ist bei oberflächlichen Einzelkolonien von Vibrio Metschnikoff kein wesentlicher Größenunterschied bezüglich der Zahl lebender Keime zu konstatieren, wenn man die Kolonien auf Platten von 20 ccm Peptonwasser-Agar auswachsen läßt, anstatt auf solchen von 10 ccm desselben Agars.

Gartoch und Kanewskaja lassen auf Grund einer Mitteilung von Voigtländer (14) und Hüfner (15), daß die Diffusion in 2 –3%igen Agargallerten im Vergleich zu derjenigen im Wasser nur wenig gehemmt sei, dieses physikalische Moment bei ihren Betrachtungen völlig beiseite.

Daß es jedoch für das Bakterienwachstum auf festen Nährböden nicht ohne Bedeutung ist, wurde von jeher angenommen, von Liesegang (16) experimentell belegt und von Ilzhöfer und v. Angerer quantitativ untersucht.

Sie finden, daß die in die Stelle des Verbrauches eindiffundierende Menge an Nährstoffen mit großer Annäherung direkt proportional zur Zeit ist. Mithin wäre also die Bakterienvermehrung auf festen Nährböden nicht nur eine Funktion zwischen Nährbodenmenge und Bakterienzahl, sondern gerade bei dicken Platten auch eine solche der Zeit.

Auch ohne die experimentelle Widerlegung durch Gotschlich, Weigang, Ilzhöfer und v. Angerer wäre daher schon bei reiner Überlegung schwerlich einzusehen, daß bei gleicher Plattengröße, nach gleichem Zeitablauf und der doch in beiden Platten gleichen Diffusionsgeschwindigkeit der entscheidenden Nährstoffe die dicke Platte einen derartigen Vorsprung bezüglich der Zahl der Lebenden haben soll, wie er von Gartoch und Kanewskaja behauptet wird. Zumal durch weitere Versuche Ilzhöfers und v. Angerers bewiesen wird, daß bei Agar überhaupt nur die obersten Schichten einer Platte für die Ernährung ausgenutzt werden.

Ist demnach der Vorzug dicker Platten gegenüber dünnen bezüglich der Absoluten Bakterienzahl als der Zahl der gleichzeitig Lebenden noch keineswegs hinreichend bewiesen, so macht man doch da, wo es sich um Erzielung der größtmöglichen Gesamtzahl an Bakterien (gleichgültig ob lebend oder tot) handelt, das ist z. B. bei der Vaccinebereitung, heute allgemein Gebrauch von verhältnismäßig dicken Platten. Ausschlaggebend hierfür war die schon mit bloßem Auge immer wieder zu machende Beobachtung eines weit üppigeren Bakterienrasens auf derartigen Platten, worin man geneigt war, einen prinzipiellen Vorteil vor dünnen Platten zu sehen. Es bleibt aber auch hier noch zu untersuchen, in wieweit dieses Vorgehen in ökonomischer Hinsicht gerechtfertigt ist.

Unter diesem praktischen Gesichtspunkt standen weitere Versuche von russischer Seite (11). Es wird hierbei zunächst ganz allgemein festgestellt, daß die Vermehrung der Bakterienernte direkt proportional sei der für die Einheit der Oberfläche verwandten Nährbodenmenge. Denn bei Beschickung eines Kulturgefäßes von 100 ccm Fassungsvermögen mit 50 ccm Agar erzielte man eine Ernte von 1148 Milliarden Keimen, bei Beschickung mit 100 ccm Agar eine solche von 2268 Milliarden. Damit hat aber auch die Nährbodenvermehrung bezüglich der Rentabilität schon ihre obere Grenze erreicht, denn bei Verwendung des Vier- und Sechsfachen der Ausgangsmenge an Nährgallerte erfährt die Ernte nur eine ganz unwesentliche Steigerung.

Von einem absoluten Gewinn kann jedoch, wie man sieht, bei dieser Maßnahme nicht die Rede sein, denn schließlich ist nur genau das Mehr an Ernte erzielt worden, was an Agar mehr angewandt worden war.

Nach Angaben Ilzhöfers und v. Angerers liegen die Verhältnisse noch nicht einmal so günstig. Sie beobachteten für die Dauer von zwei Wochen die Volumenzunahme tiefliegender

Einzelkolonien von Bakt. coli in verschieden großen Gelatinemengen (5, 10, 20, 30 ccm).

Dabei fanden sie, daß die Kolonien fast zwei Wochen lang meßbar an Größe zunahmen und zwar linear zur Zeit, was sie aus dem ebenfalls proportional zur Zeit erfolgenden Nachdiffundieren von Nährstoffen erklären. Bei der Bestimmung der Gesamternte aus der Summe der Kolonievolumina kommen sie dann zu dem Ergebnis, daß die Gesamternte mit steigendem Gelatinevolumen zwar zunimmt, aber nicht in linearer Funktion sondern nur proportional dem Logarithmus der aufgewandten Nährbodenmenge.

Scheinen auch die beiden Versuchsanordnungen nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar, da es sich im einen Fall um eine massive Oberflächenaussaat auf Agar (Bebrütungstemperatur = 37°), im anderen um tiefliegende Einzelkolonien in Gelatine (Bebrütungstemperatur = 22°) handelt, so liegt doch kein Grund vor, bei der langen Bebrütungsdauer von zwei Wochen und der damit verbundenen ununterbrochenen Diffusionsmöglichkeit in die von allen Seiten in Nährgallerte eingebetteten und noch dauernd wachsenden Kolonien eine geringere Ausnutzung des Nährbodens anzunehmen als durch die zwar massive aber oberflächliche und nur kurz bebrütete Aussaat. Zumal bei massiver Aussaat die wesentliche Vermehrung bereits nach 12 Stunden im großen ganzen als abgeschlossen angesehen werden kann.

II.

Das Verhältnis zwischen optimaler Nährbodenmenge und Gesamternte bei Massenkulturen auf Agar näher zu prüfen, war daher Aufgabe meiner Versuche.

Als Versuchsbakterium wurde durchgehends das Bakt. coli verwandt, während ein apathogener Kokkenstamm zur Kontrolle der für Bakt. coli gefundenen Verhältnisse diente. Der verwandte Coli-Stamm war für alle Versuche der gleiche und wurde nach Isolation aus einem Stuhlausstrich für die Dauer der Versuche auf Schrägagarröhrchen fortgezüchtet.

Als Nährboden diente gewöhnlicher Fleischwasser-Pepton-Agar von folgender Zusammensetzung:

400 g Fleisch
10 g Pepton

5 g Kochsalz
2 g Liebigs Fleischextrakt
1000 ccm Wasser
20 g Agar.

Bei der weitaus größten Zahl der Versuche wurde dieser 2%ige Agar verwendet, und nur im letzten Versuche wurde aus technischen Gründen eine konsistentere 3%ige Gallerte gewählt.

Für zusammengehörige Versuchsreihen kam zum Zwecke möglichst gleicher Versuchsbedingungen selbstverständlich nur Agar gleichen Herstellungsdatums zur Verwendung. Zur Vermeidung unterschiedlichen Wassergehaltes durch Austrocknung wurden die jeweils zu einer Versuchsreihe benötigten Kulturgefäße stets gleichzeitig mit der Nährgallerte beschickt und nach Erstarrung derselben weiter verarbeitet.

An Kulturgefäßen fanden Petri-Schalen von 9,5, 12 und 15 cm Durchmesser Verwendung, deren Flächeninhalt sich nach genauerer Messung und Berechnung auf etwa 65 qcm, 95 qcm und 150 qcm beläuft, und Kolle-Schalen von einem planimetrisch festgestellten Flächeninhalt von ungefähr 230 qcm. Diese Gefäße wurden mittels steriler Bürette mit Agar in den bei den einzelnen Versuchen angegebenen, genau gemessenen Mengen gefüllt.

Nach Erstarrung desselben erfolgte die Beimpfung durch massive Einsaat. Zu diesem Zwecke wurden Emulsionen hergestellt, die jeweils eine Normalöse der Bakterienmasse = rund 1 Milliarde Keime auf 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung enthielten und die mittels steriler Pipetten in Mengen von 0,5 ccm, 1 ccm, 1,5 ccm und 2 ccm auf die Kulturflächen von 65, 95, 150 und 230 qcm gebracht wurden. Durch Hin- und Herneigen der Platten wurde für ihre gleichmäßige Überspülung mit der Beimpfungsflüssigkeit gesorgt, sodaß bei 24 bezw. 48 stündiger Bebrütung im 37°-Schrank ein zusammenhängender, dichter Bakterienrasen auswachsen konnte.

Für die Gewinnung der Ernte erschien entgegen der bei der Vaccine-Bereitung häufig geübten Methode des Abkratzens die alte Methode des Abschwemmens des Bakterienrasens mit physiologischer Kochsalzlösung geeigneter, da sie weit mehr Gewähr für ein annähernd quantitatives Erfassen der gewachsenen Keime bietet. Außerdem waren für die prinzipiell auf die Feststellung der Quantität hinzielenden Versuche etwaige bei der Abschwemmung in Lösung gehende Nährbodensubstanzen, die man in der Praxis durch das Abkratzen zu vermeiden trachtet, gleichgültig. Es war sogar bei der später noch zu beschreibenden Bestimmungs-

methode der erzielten Bakterienmenge wünschenswert, diese Nährbodenbeimengungen wenn überhaupt, dann nur in gelöster Form zu erhalten, da korpusculäre Nährbodenbeimengungen, wie sie beim Abkratzen der Platte vorkommen können, das Resultat hätten trüben können.

Die ausgewachsenen Kulturflächen wurden, wie schon von Gotschlich und Weigang (12) empfohlen, mit bestimmten Mengen physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, eine Maßnahme, die zum Zwecke möglichster Erfassung aller Keime mehrmals mit frischer Kochsalzlösung wiederholt wurde, wobei die einzelnen Abschwemmungen der betreffenden Kultur in einem größeren Gefäß (Schüttelzylinder) gesammelt wurden.

Es hatte nun die Bestimmung des Bakteriengehaltes der so erhaltenen Aufschwemmungen zu erfolgen. Hierfür stehen zwar eine größere Anzahl von Methoden zur Verfügung, deren Genauigkeit und Exaktheit jedoch sehr umstritten sind. Vor allem treffen diese Mängel für die Keimzählmethoden zu, gleichgültig, ob es sich um die direkte Auszählung mittels Zählkammer im Dunkelfeld handelt, oder um das Wright'sche Zählverfahren, bei dem die Zahl der Bakterien einer Suspension aus ihrem zahlenmäßigen Verhältnis zu den Erythrocyten einer bekannten Blutsuspension ermittelt wird. Bei letzterem Verfahren berechnet sich die Unterschätzung der Keimzahl nach Dold (17) auf 100 bis 200%. Ebenfalls unbefriedigend sind die Resultate bei der direkten Auszählung. Auch die Ermittlung der Keimzahl durch Bestimmung der Trockensubstanz oder des Stickstoffgehaltes mittels Mikro-Kjeldahl erfreut sich in der modernen bakteriologischen Technik wegen ihrer Kompliziertheit keiner häufigen Anwendung. Am meisten gebraucht werden heute die Methoden der Nephelometrie und die der Messung der ausschleuderbaren Niederschlagsmenge, welch letztere von H. Schmidt (18), (19) zu dem sog. „Kapillar-Zentrifugierverfahren" ausgearbeitet worden ist. Beide Methoden machen jedoch ebenfalls keinen Anspruch auf absolute zahlenmäßige Genauigkeit, sondern begnügen sich mit relativen Werten und wollen nur eine einigermaßen einfache und rasche Handhabe zur Abschätzung der Keimzahl in Bakteriensuspensionen bieten.

Bei der großen Anzahl gleichzeitig zu bestimmender Suspensionen war das Zentrifugierverfahren für mich die Methode der Wahl. Da es jedoch bei meinen Versuchen weniger auf das zahlenmäßige Erfassen der Bakterien als auf möglichst brauchbare Vergleichswerte ankam, wurde auf die Feinheiten des

Schmidt'schen Verfahrens, soweit sie der Angabe des Keimgehaltes in absoluten Zahlen dienen, verzichtet. Die Methode wurde deshalb dahingehend vereinfacht, daß Zentrifugierröhrchen mit angeschmolzener graduierter Kapillare mit der ganzen bezw. einem aliquoten Teil der zu bestimmenden Bakterienemulsion gefüllt und eine Stunde lang mit 3500 Touren pro Minute zentrifugiert wurden. Nach dieser Zeit war stets völlige Klärung der Flüssigkeit und mit wenigen Ausnahmen auch ein gutes Absetzen der Bakterienmasse in der Kapillare eingetreten.

Das Fassungsvermögen des Röhrchens betrug etwa 3 ccm, dasjenige der Kapillare genau 0,1 ccm. Ihre Unterteilung in 20 Teile, $^5/_{1000}$ ccm also, gestattete eine Ablesung der ausgeschleuderten Bakteriensäule bis auf Kubikmillimeter. Die auf diese Weise erzielten Werte verstehen sich natürlich nur für diese Methode und sind nicht vergleichbar mit anderweitig angegebenen und durch andere Methoden erzielten Resultaten.

Mit zunehmender Größe der Kulturgefäße und steigenden Ernten war es unmöglich, die einzelnen Emulsionen im ganzen in diesen Röhrchen zu zentrifugieren, zumal bei den konzentrierteren Abschwemmungen kein völliges Absetzen der Bakterien bei ein- und mehrstündigem Zentrifugieren zu erreichen war. Es machten sich deshalb im Laufe der Untersuchungen Verdünnungen der Original-Abschwemmungen nötig, die schließlich zum Zwecke der Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen bei allen Ernten vorgenommen werden mußten. Dabei wurde so vorgegangen, daß die Original-Abschwemmungen in Schüttelzylinder eingefüllt, bis zu einem bestimmten Grade mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt und zwecks gleichmäßiger Verteilung der Keime in der Flüssigkeit vor dem Zentrifugieren eine halbe Stunde mit Glasperlen im Schüttelapparat geschüttelt wurden. Dann wurde ein bestimmter Teil (2 ccm) einer solchen verdünnten Suspension in die Zentrifugierröhrchen gefüllt, zentrifugiert, abgelesen, und das Resultat auf die Gesamtmenge umgerechnet. Diese Bestimmung wurde in den letzten Versuchsreihen für jede Suspension dreimal durchgeführt; die Abweichungen der einzelnen Werte vom Mittelwert und die Berechnung des mittleren Fehlers sind dort verzeichnet.

III.

Bevor zu der eigentlichen Versuchsanordnung übergegangen werden konnte, war es nötig, sich durch einen Vorversuch über die Größe des Abschwemmungsfehlers zu orientieren.

Dazu wurden vier gleich große Platten von 9,5 cm Durchmesser mit je 10 ccm Agar beschickt, mit je 0,3 ccm derselben Coli-Aufschwemmung gleichmäßig überspült und nach 24 stündiger Bebrütung bei 37° jeweils mit 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Die vier Emulsionen zeigten nach einstündigem Zentrifugieren einen Bakteriengehalt von: 0,103 ccm, 0,111 ccm, 0,108 ccm und 0,107 ccm, woraus sich als Mittel der Wert von 0,107 ccm, als mittlerer Fehler der Einzelmessung der Wert von $\pm$ 0,0033 ccm und als mittlerer Fehler des Mittelwertes derjenige von $\pm$ 0,0017 ccm ergibt.

Die Ernten von fünf mit je 20 ccm Agar beschickten Platten von 9,5 cm Durchmesser, die im übrigen ganz analog den obigen behandelt worden waren, betrugen: 0,240 ccm, 0,240 ccm, 0,230 ccm, 0,240 ccm, 0,240 ccm, das arithmetische Mittel mithin 0,238, der mittlere Fehler der Einzelmessung $\pm$ 0,0045 ccm, derjenige des Mittelwertes $\pm$ 0,0020 ccm.

Bei den einzelnen Versuchen wurde so vorgegangen, daß Agarnährboden in steigenden Mengen in die Kulturgefäße eingefüllt wurde, wodurch Kulturflächen von verschiedener Dicke erzielt wurden, deren Einfluß auf die Größe der Ernte zu beobachten war.

Es lag nahe, dieses Verhältnis zwischen Nährbodenmenge und Bakterienernte zunächst für die meist gebrauchten Petri-Schalen von 9,5 cm Durchmesser (= 65 qcm Flächeninhalt) zu prüfen.

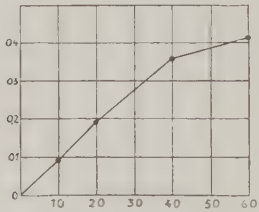
Deshalb wurden vier möglichst gleich ausgesuchte Schalen dieser Größe, deren Durchmesser um höchstens 2 mm voneinander abwichen, mit 10, 20, 40 und 60 ccm Agar beschickt. Nach Beimpfung jeder Platte mit 0,3 ccm einer Coli-Aufschwemmung (1 Normalöse auf 10 ccm phys. NaCl-Lösung) war auf allen Platten nach 24 stündiger Bebrütung ein zusammenhängender Bakterienrasen ausgewachsen, dessen Gehalt an Keimen, nach der vorher beschriebenen Methode bestimmt, folgende Werte hatte:

Petri-Schale von 9,5 cm Durchmesser beschickt mit Agarmenge von:	Nach 24 stdg. Bebrütung erzielte Bakterienmenge von:
10 ccm	0,09 ccm
20 „	0,19 „
40 „	0,36 „
60 „	0,41 „

Dabei war jede Platte mit 4 ccm phys. Kochsalzlösung abgeschwemmt und die ganze Suspension zentrifugiert worden.

Graphisch dargestellt ergeben diese Werte eine Kurve von zunächst scheinbar linearem Verlauf, die bei 40 ccm Agar (= 0,36 ccm Ernte) jedoch deutlich umbiegt und sich der x-Achse des Koordinatensystems nähert.

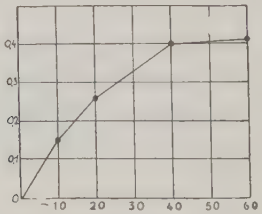
Graphische Darstellung.



Derselbe Versuch mit Kokken angestellt, liefert im einzelnen zwar naturgemäß andere Werte, die aber kurvenmäßig das gleiche Bild ergeben, wie es oben geschildert wurde. Auch hier wächst die Größe der Ernte nicht direkt proportional mit der Vermehrung des Nährbodens, sondern bleibt hinter ihr zurück, was in dem Intervall von 40 auf 60 ccm Agar besonders sinnfällig wird:

Petri-Schale von 9,5 cm Durchmesser beschickt mit Agarmenge von:	Nach 24 stdg. Bebrütung erzielte Bakterienmenge (Kokken) von:
10 ccm	0,150 ccm
20 „	0,255 „
40 „	0,400 „
60 „	0,410 „

Graphische Darstellung.



Beim Beimpfen dieser Platten war aufgefallen, daß die Bildung von Kondenswasser mit der Menge des eingefüllten Agars wesentlich zunahm, und daß Platten von 20, 40 und 60 ccm in steigendem Maße mit Wassertröpfchen beschlagen waren. Es

war deshalb in Anbetracht der herrschenden Meinung über den wachstumsfördernden Einfluß des Kondenswassers schon interessant festzustellen, daß trotz des sehr vermehrten Kondenswassers auf dicken Platten kein entsprechend verbessertes Wachstum eintrat. Zur genaueren Prüfung des Einflusses dieses Faktors auf das Endresultat an Ernte wurden Platten derselben Zusammensetzung und Füllung vor dem Beimpfen bis zum völligen Verschwinden des Kondenswassers im Trockenschrank gehalten und dann wiederum mit 0,3 ccm einer Aufschwemmung von Bakt. coli besät, die diesmal mit dem Spatel auf den Platten verteilt werden mußte, da die Flüssigkeitsmenge für ein gleichmäßiges Überspülen bei getrockneten Platten nicht mehr ausreichend war. Nach 24 Stunden war jedoch kein nennenswerter Unterschied bezüglich der Ernte gegenüber nicht getrockneten Platten festzustellen.

Ernten von getrockneten Platten.

Petri-Schale von 9,5 cm Durchmesser beschickt mit Agarmenge von:	Nach 24 stdg. Bebrütung erzielte Bakterienmenge von:
10 ccm	0,105 ccm
20 „	0,195 „
40 „	0,350 „
60 „	0,400 „

Anmerkung: Abschwemmung mit 4 ccm phys. Kochsalzlösung, Bestimmung der ganzen Abschwemmung.

Zum Zwecke der Erreichung der für die graphische Darstellung wünschenswerten Zwischenwerte wurde beim nächsten Versuch die Agarmenge von 10 zu 10 ccm gesteigert, wobei die dickste Platte schließlich mit 70 ccm gegossen wurde. Die Original-Abschwemmungen wurden hierbei verdünnt und kamen jeweils nur in einer Menge von 4 ccm zur Bestimmung. Da aber die Fehlerquellen der Methode für ein feineres Interpolieren doch wohl zu groß sind, waren die erzielten Zwischenwerte unbefriedigend. Jedoch wurde der aus den früheren Versuchen zu erwartende Verlauf der Kurve im ganzen innegehalten. Denn es ergab sich wiederum eine nur ganz geringfügige Zunahme der Ernte bei Vermehrung des Agars von 40 auf 70 ccm.

Petri-Schale von 9,5 cm Durchmesser beschickt mit Agarmenge von:	Nach 24 stdg. Bebrütung erzielte Bakterienmenge von:
10 ccm	0,090 ccm
20 „	0,200 „
30 „	0,250 „
40 „	0,325 „
50 „	0,300 „
60 „	0,300 „
70 „	0,350 „

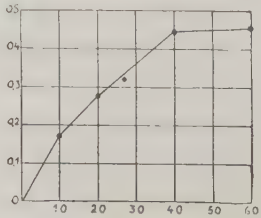
Diese Resultate deckten sich mit dem von den russischen Autoren festgestellten Mißverhältnis zwischen Ernte und Nährboden bei Vermehrung desselben über ein gewisses Maß hinaus. Für die Petri-Schale von 9,5 cm Durchmesser liegt diese obere Grenze etwa bei 40 ccm Agar. Jedoch wächst die Ausbeute selbst bis zu diesem Punkte nicht, wie von Gartoch und Kanewskaja (11) angenommen, vollständig linear mit dem Nährbodenangebot, sondern, wie sich aus der weiteren Verfolgung der Kurve und ihrer logarithmischen Eintragung ergibt, annähernd proportional dem Logarithmus der Nährbodenmenge.

Als Beispiel seien die Werte der Ernten von Petri-Schalen von 9,5 cm Durchmesser (24 Stunden Bebrütung) mit den zugehörigen Kurven gegeben:

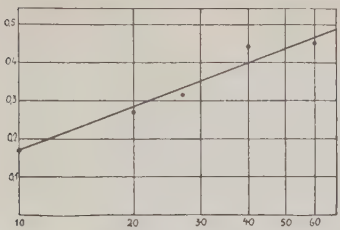
Platten von 9,5 cm Durchm. beschickt mit Agarmenge von:	Nach 24 stdg. Bebrütung erzielte Bakterienmenge von:	Mittlerer Fehler des Mittelwertes:
10 ccm	0,170 ccm	± 0,0153
20 „	0,267 „	± 0,0120
27 „	0,313 „	± 0,0067
40 „	0,440 „	± 0,0115
60 „	0,447 „	± 0,0133

Anmerkung: Original-Abschwemmungen auf 40 ccm aufgefüllt. Es erfolgte eine dreimalige Bestimmung von jeweils 2 ccm jeder Aufschwemmung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus diesen drei Messungen.

Graphische Darstellung.



Logarithmische Eintragung.



Mittlere Abweichung der Beobachtungspunkte von der zur Ausgleichung hindurchgelegten Gerade: ± 0,0262 ccm

Dieses Verhältnis hatten Ilzhöfer und v. Angerer (13) bereits bei anderen Versuchsanordnungen für die Größenzunahme tiefliegender Kolonien gefunden, und es bedurfte deshalb zur Prüfung seiner Gültigkeit für Oberflächenkolonien noch weiterer Versuche.

Diese wurden außer mit den zur Kontrolle nochmals mitlaufenden Petri-Schalen von 9,5 cm Durchmesser (= 65 qcm Fläche) mit Platten von 12 und 15 cm Durchmesser (= 95 und 150 qcm Fläche) und Kolle-Schalen (= 230 qcm Fläche) vorgenommen, die diesmal 24 und 48 Stunden bebrütet wurden zum Zwecke der Prüfung einer etwaigen Bakterienzunahme nach verlängerter Bebrütungszeit.

Sämtliche Kulturgefäße wurden bei diesem Parallelversuch mit 3%igem Agarnährboden beschickt, da dieser bei den Kolle-Schalen bessere Abschwemmungsmöglichkeiten schuf.

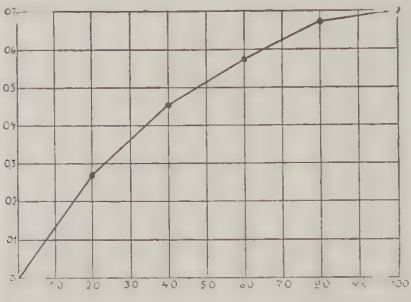
Es zeigte sich nach 24stündiger Bebrütung der für die Ernten der Petri-Schalen von 9,5 cm Durchmesser schon bekannte und wieder eingetroffene logarithmische Kurvenverlauf in besonders exakter Form auch bei den Ernten der Platten von 12 cm Durchmesser, deren Zahlenwerte sowohl, wie auch graphische Darstellung und logarithmische Eintragung hier angeführt seien:

Platten von 12 cm Durchm. beschickt mit Agarmenge von:	Nach 24stdg. Bebrütg. erzielte Bakterienmenge von:	Mittlerer Fehler des Mittelwertes:
20 ccm	0,273 ccm	± 0,0067
40 „	0,447 „	± 0,0088
60 „	0,567 „	± 0,0067
80 „	0,673 „	± 0,0176
100 „	0,700 „	± 0

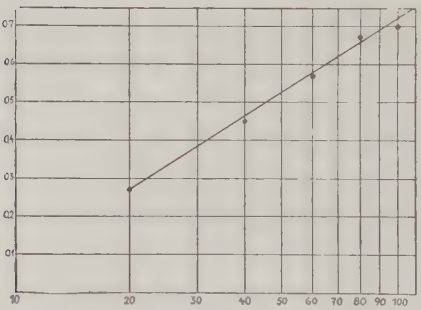
Anmerkung: Die Original-Abschwemmungen wurden auf 40 ccm aufge-

füllt. Es erfolgte eine dreimalige Bestimmung von jeweils 2 ccm jeder Aufschwemmung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus diesen drei Messungen.

Graphische Darstellung.



Logarithmische Eintragung.



Mittlere Abweichung der Beobachtungspunkte von der zur Ausgleichung hindurchgezogenen Geraden: $\pm$ 0,0137 ccm.

Bei den Platten von 15 cm Durchmesser war nach diesem Zeitraume ein merkliches Zurückbleiben der Ernten von den dicksten Agarschichten (80—140 ccm) hinter der anfänglich logarithmisch verlaufenden Vermehrungskurve zu konstatieren, eine Erscheinung, die mir in gleicher Weise schon bei einem früheren Versuche mit dieser Plattengröße begegnet war.

Wenig befriedigend waren die Werte, die die Ernten von Kolle-Schalen lieferten. Bei logarithmischer Eintragung zeigten sie ein starkes Abweichen nach beiden Seiten von der durch die einzelnen Beobachtungspunkte gegebenen Ausgleichsgerade, wobei die Summe der Abweichungen nach oben und unten etwa gleich groß war.

Der Grund hierfür liegt wohl in der bei diesen Gefäßen viel größeren technischen Schwierigkeit für ein quantitatives Abschwemmen und dem schlechteren Absedimentieren der Keime in stark konzentrierten Emulsionen, zwei Momente, die die Fehlerbreite dieses Versuches erheblich vergrößerten. Denn bei logarithmischer Eintragung betrug die mittlere Abweichung der Beobachtungspunkte von der zur Ausgleichung hindurchgelegten Gerade bei Kolle-Schalen etwa das Fünffache der mittleren Abweichung bei Platten von 9,5 cm Durchmesser und rund das Neunfache derjenigen bei Platten von 12 cm Durchmesser, ein Mißverhältnis, dem auch durch mehrmalige Wiederholung des Versuches und feineres Interpolieren zwischen den eingefüllten Agarquanten nicht abzuhelfen war.

Der zweite Teil der in demselben Arbeitsgang angelegten Kulturen wurde nach 48stündiger Bebrütung untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die Ernten von dünneren Platten merkwürdigerweise hinter den 24stündigen an Menge zurückblieben, was unter Umständen in einer inzwischen eingetretenen Autolyse abgestorbener Bakterien seinen Grund haben könnte, diejenigen von dickeren Platten hingegen die Erträge nach 24stündiger Bebrütung übertrafen, was aus dem inzwischen möglich gewordenen Nachdiffundieren von Nährstoffen aus der Tiefe der dicken Platten ohne weiteres zu erklären ist.

Dieses Verhalten war auch bei meinen früheren Versuchen durchweg zu beobachten gewesen.

Der Anstieg der Ernten auf dicken Platten war jedoch auch nach 48stündiger Bebrütung nie so steil, daß er eine lineare Kurve ergeben hätte, sondern auch hier wird mit großer Annäherung der logarithmische Verlauf eingehalten, der jetzt auch von den Ernten der dickschichtigen 15 cm Durchmesser-Platten erreicht wurde.

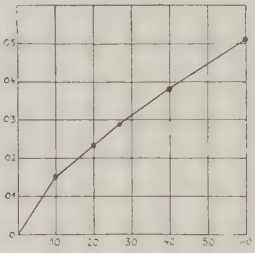
Als Beispiele mögen diesmal die Resultate der Platten von 9,5 und 12 cm Durchmesser dienen:

Platten von 9,5 cm Durchm. beschickt mit Agarmenge von:	Nach 48stdg. Bebrütg. erzielte Bakterienmenge von:	Mittlerer Fehler des Mittelwertes:
10 ccm	0,150 ccm	± 0
20 „	0,233 „	± 0,0067
27 „	0,287 „	± 0,0067
40 „	0,377 „	± 0,0145
60 „	0,513 „	± 0,0133

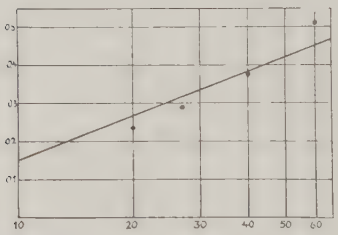
Anmerkung: Die Original-Abschwemmungen wurden auf 40 ccm aufge-

füllt. Es erfolgte eine dreimalige Bestimmung von jeweils 2 ccm jeder Aufschwemmung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus diesen drei Messungen.

Graphische Darstellung.



Logarithmische Eintragung.

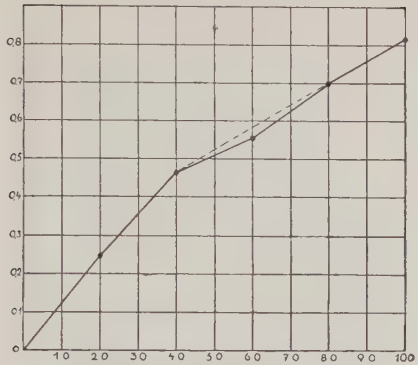


Mittlere Abweichung der Beobachtungspunkte von der zur Ausgleichung hindurchgelegten Geraden: ± 0,0348 ccm.

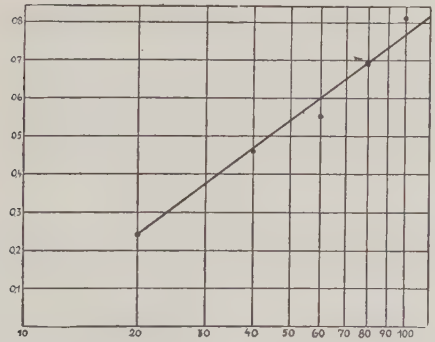
Platten von 12 cm Durchm. beschickt mit Agarmenge von:	Nach 48 stdg. Bebrütung erzielte Bakterienmenge von:	Mittlerer Fehler des Mittelwertes:
20 ccm	0,240 ccm	± 0,0115
40 „	0,460 „	± 0,0115
60 „	0,550 „	± 0,0058
80 „	0,693 „	± 0,0133
100 „	0,813 „	± 0,0133

Anmerkung: Die Original-Abschwemmungen wurden auf 40 ccm aufgefüllt. Es erfolgte eine dreimalige Bestimmung von jeweils 2 ccm jeder Aufschwemmung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus diesen drei Messungen.

Graphische Darstellung.



Logarithmische Eintragung.

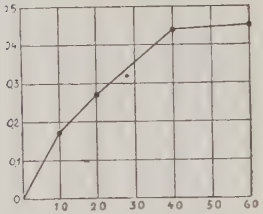


Mittlere Abweichung der Beobachtungspunkte von der zur Ausgleichung hindurchgelegten Geraden: $\pm$ 0,0320 ccm.

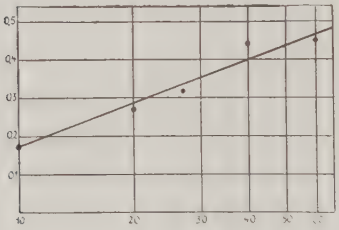
Gegenüberstellung der Ernten nach 24 stdg. Bebrütung.

Platten von 9,5 cm Durchm. beschickt mit Agarmenge von:	Nach 24 stdg. Bebrütung erzielte Bakterienmenge von:	Mittlerer Fehler des Mittelwertes:
10 ccm	0,170 ccm	$\pm$ 0,0153
20 „	0,267 „	$\pm$ 0,0120
27 „	0,313 „	$\pm$ 0,0067
40 „	0,440 „	$\pm$ 0,0115
60 „	0,447 „	$\pm$ 0,0133

Graphische Darstellung.



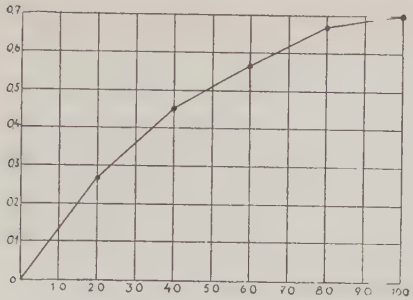
Logarithmische Eintragung.



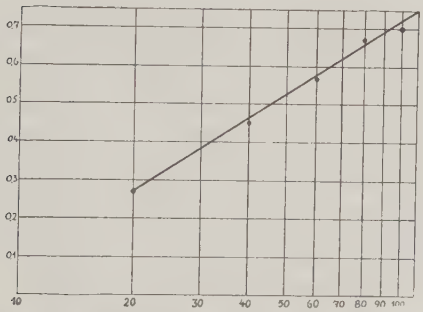
Mittlere Abweichung der Beobachtungspunkte von der zur Ausgleichung hindurchgelegten Geraden: $\pm$ 0,0262 ccm.

Platten von 12 cm Durchm. beschickt mit Agarmenge von:	Nach 24 stdg. Bebrütung erzielte Bakterienmenge von:	Mittlerer Fehler des Mittelwertes:
20 ccm	0,273 ccm	$\pm$ 0,0067
40 „	0,447 „	$\pm$ 0,0088
60 „	0,567 „	$\pm$ 0,0067
80 „	0,673 „	$\pm$ 0,0176
100 „	0,700 „	$\pm$ 0

Graphische Darstellung.



Logarithmische Eintragung.



Mittlere Abweichung der Beobachtungspunkte von der zur Ausgleichung hindurchgelegten Geraden: $\pm$0,0137 ccm.

Die Ergebnisse der angeführten Versuche und die Resultate sämtlicher übrigen Kontrollversuche stimmen ohne Ausnahme darin überein, daß die Größe der Bakterienernte keineswegs direkt proportional ist der für die Einheit der Oberfläche verwandten Nährbodenmenge. Die graphische Darstellung ergab in jedem Falle eine Kurve, die weit eher einen dem Logarithmus der Nährbodenmenge entsprechenden, als einen linearen Anstieg hatte. Die logarithmische Eintragung ergab Geraden, die bemerkenswerterweise für die gleiche Plattengröße jeweils annähernd das gleiche Steigungsmaß hatten. Es ist naheliegend, hierin den Einfluß einer Naturkonstanten zu vermuten, als welche in diesem Falle wohl vor allem die Diffusionskonstante in Betracht käme.

Zur Sicherstellung dieser Vermutung bedürfte es allerdings noch weiterer Versuche mit Agargallerten verschiedener Konsistenz.

Damit scheint die Ansicht Ilzhöfers und v. Angerers (13) auch für Oberflächenkolonien zutreffender als die der russischen Autoren. Denn selbst bei der von letzteren als optimal angesehenen Verdoppelung der Nährbodenmenge war kaum je das Doppelte an Ernte zu erzielen, obgleich die Anfangsmengen (10 ccm auf 65 qcm bei der 9,5 cm ∅ Platte, 20 ccm auf 95 qcm Fläche bei der 12 cm ∅ Platte) absichtlich sehr niedrig gehalten wurden und nur eine sehr dünne Nährbodenschicht bildeten.

Vom Gesichtspunkt der reinen Agarersparnis aus erwiesen sich mithin die dünnsten Platten stets als die rentabelsten, und das Mißverhältnis zwischen Aufwand und Ertrag wurde mit steigender Agarmenge nur immer größer, was durch folgende Gegenüberstellung nochmals demonstriert sei:

Bei 24 stündiger Bebrütung (37°)

Agarmenge	Ernte von 65 qcm	Mittlerer Fehler	Ernte von 95 qcm	Mittlerer Fehler
10 ccm	0,170 ccm	± 0,0153		
20 „	0,267 „	± 0,0120	0,273 ccm	± 0,0067
40 „	0,440 „	± 0,0115	0,447 „	± 0,0088
60 „	0,447 „	± 0,0133	0,567 „	± 0,0067
80 „			0,673 „	± 0,0176
100 „			0,700 „	± 0

Wie bereits betont, liegen die Dinge nach 48 stündiger Bebrütung für dicke Platten zwar etwas günstiger, da aber bei der Vaccine-Bereitung nur viel kürzere Brutzeiten angezeigt sind, dürfte sich die Beurteilung der Rentabilität dicker Platten nach dem Gesichtspunkt einer längeren Bebrütungsdauer von vornherein erübrigen. Besonders da selbst nach 48 stündiger Bebrütung der Vorteil, den mehrere dünne Platten gegenüber einer dicken hinsichtlich des Ertrages bieten würden, nicht einzuholen ist.

Wenn in der Praxis der Impfstoffherstellung von dicken Platten weitgehend Gebrauch gemacht wird, so kommt man damit zwar dem Bedürfnis nach Vereinfachung des Arbeitsganges, Erleichterung der Technik und Zeitersparnis entgegen, erzielt aber dabei nach den vorliegenden Versuchsergebnissen nicht die maximale Ausnutzung des Nährbodens.

An dieser Stelle möchte ich nicht versäumen, Herrn Professor Schütz für seine liebenswürdige Beratung und Hilfeleistung meinen Dank auszusprechen. Die mathematische Ausdeutung verdanke ich Herrn Professor Kaluza, die Aufschluß gebenden Vorbesprechungen Herrn Geheimrat Reichenbach.

Schrifttum.

1. Eijkmann, C., Über die Ursache der Wachstumshemmung in Bakterienkulturen. Deutsche Medizinische Wochenschrift 1907, S. 265.
2. Conradi u. Kurpjuweit, Über spontane Wachstumshemmung der Bakterien infolge Selbstvergiftung. Münchner Medizinische Wochenschrift 1905, Nr. 37.
3. —, Über die Bedeutung der bakteriellen Hemmungsstoffe für die Physiologie und Pathologie des Darmes. Münchner Medizinische Wochenschrift 1905, Nr. 45 u. 46.
4. Rahn, O., Über den Einfluß der Stoffwechselprodukte auf des Wachstum der Bakterien. Zentralblatt für Bakteriologie, II. Abt., Bd. 14, S. 417.
5. Moro, E. und Murath, F., Über die bakteriellen Hemmungsstoffe des Säuglingsstuhles. Wiener Klinische Wochenschrift 1906, S. 371.
6. Bail, O., Entstehung und Gesetze von Bakterienpopulationen; soziologische Studien an Dysenteriebazillen. Archiv für Hygiene, Band 95, 1925, S. 1.
7. —, Untersuchungen über die M-Konzentration von Bakterien und Bakteriophagen. Archiv für Hygiene, Band 94, 1924, S. 55.
8. Singer, E. und Hoder, F., Über die physiologische Grenze der Bakterienvermehrung. Archiv für Hygiene, Band 94, 1924, S. 353.
9. Hirsch, J., Zur Biochemie pathogener Erreger. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Band 106, 1926, S. 433.
10. Hahn, M. und Hirsch, J., Studien über das Choleragift. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Band 110, 1929, S. 355.
11. Gartoch, O. O. und Kanewskaja, M. J., Zur Frage der „Bakterienzahl". Sow. wratsch. Gaseta 1932, Nr. 27.
12. Gotschlich, E. und Weigang, J., Über die Beziehungen zwischen Virulenz und Individuenzahl einer Choleracultur. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Band 20, 1895, S. 376.
13. Ilzhöfer, H. und von Angerer, K., Über die Bedeutung der Diffusionsvorgänge für das Koloniewachstum. Archiv für Hygiene, Band 96, 1926, S. 237.
14. Voigtländer, F., Über die Diffusion in Agargallerte. Zeitschrift für physikalische Chemie, Band 3, S. 329.
15. Hüfner, O., Über die Diffusion von Gasen durch Wasser und Agargallerte. Zeitschrift für physikalische Chemie, Band 27, S. 227.
16. Liesegang, R. E., Gegenseitige Wachstumshemmung bei Pilzkulturen. Centralblatt für Bakteriologie, II. Abteilung, Band 51, S. 85.
17. Dold, H., Kritische Betrachtungen über Bestimmung und Bewertung der Keimzahl bakterieller Impfstoffe. Deutsche Medizinische Wochenschrift 1925, Nr. 45.
18. Schmidt, H., Ein Verfahren, die maximalen und minimalen Keimzahlwerte von Bakteriensuspensionen zu bestimmen. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Band 106, 1926, S. 314.
19. Schmidt, H. und Fischer, E., Die Bestimmung der Keimzahl von Bakteriensuspensionen mittels des Capillarzentrifugierverfahrens. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Band 111, 1932, S. 542.

Lebenslauf.

Als Tochter des Kaufmanns Hugo Wedemann und seiner Ehefrau Ella, geb. Behrends, wurde ich am 20. Juni 1911 in Arnstadt in Thüringen geboren.

Daselbst besuchte ich zunächst die Volksschule, sodann das Lyceum und legte Ostern 1931 an der Fürst Günther-Schule zu Arnstadt die Reifeprüfung ab.

Seit dem Sommer-Semester 1931 widmete ich mich dem Studium der Medizin in Würzburg, Halle, Hamburg und Leipzig, wo ich im August 1933 die ärztliche Vorprüfung bestand. Während der klinischen Semester studierte ich in Leipzig, München und Göttingen. Hier fand mein Studium im Dezember 1936 durch das medizinische Staatsexamen seinen Abschluß.

Seit 1. Februar 1937 bin ich am Hygienischen Institut in Göttingen als Medizinalpraktikantin tätig, wo ich auch meine Doktor-Arbeit gemacht habe.

Edith Wedemann.